

四种启动子调控 *RFP* 报告基因在家蚕细胞 (Bm-e-HNU5) 内的瞬时表达

王 云, 叶向群, 吴亦亮, 桂慕燕, 左正宏*

(厦门大学生命科学院 福建厦门 361005)

摘要: 以红色荧光蛋白基因(*RFP*)为报告基因, 构建含4种不同启动子的重组表达质粒, 用脂质体介导法转染家蚕 *Bombyx mori* 细胞(Bm-e-HNU5), 观察家蚕细胞质肌动蛋白4基因启动子(A4)、 α -微管蛋白基因启动子(α -tub)、蚕丝心蛋白重链基因启动子(Fib)和家蚕核型多角体病毒早期即刻蛋白基因启动子(IE)4种启动子调控 *RFP* 报告基因在家蚕细胞内的瞬时表达情况。构建的重组表达质粒 pDsRed- α -tub、pDsRed-A4、pDsRed-IE 和 pDsRed-Fib 经双酶切和 PCR 鉴定正确无误。转染和转录实验结果表明, 除了 pDsRed-A4 外, 其他3种重组质粒在 Bm-e-HNU5 细胞中都得到高转染率, α -tub、IE 和 Fib 可依次增强 *RFP* 报告基因在家蚕细胞内的瞬时表达活性。

关键词: 家蚕; 启动子; *RFP* 报告基因; 瞬时表达活性; 脂质体介导法

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2006)02-0167-05

Comparison of four promoters for transient expression of *RFP* reporter gene in cultured *Bombyx mori* cells (Bm-e-HNU5)

WANG Yun, YE Xiang-Qun, WU Yi-Liang, GUI Mu-Yan, ZUO Zheng-Hong* (School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China)

Abstract: The red fluorescent protein reporter gene (*RFP*) was used to construct recombinant plasmids containing four different promoters, i. e., the cytoplasmic actin4 promoter (A4), α -tubulin promoter (α -tub) from silkworm, the *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus immediate early protein promoter (IE) and the fibroin heavy chain gene promoter (Fib), respectively. These recombinant plasmids, i. e., pDsRed-A4, pDsRed- α -tub, pDsRed-Fib and pDsRed-IE, had been constructed successfully by restriction enzyme digestion and PCR analysis, and then were transfected into *B. mori* cell lines (Bm-e-HNU5) by lipid-mediated method to observe the ability of the four promoters to drive *RFP* reporter gene transient expression in cells. Transfection and transcription experiments indicated that except pDsRed-A4, the other three kinds of recombinant plasmids all transfected Bm-e-HNU5 obviously. The promoters of α -tub, IE and Fib enhanced the transient expression activity of *RFP* reporter gene in the Bm-e-HNU5, and their activity strengthened sequentially.

Key words: *Bombyx mori* cells; promoter; *RFP* reporter gene; transient expression activity; lipid-mediated method

家蚕 *Bombyx mori* 已成为遗传学研究中常用的模式生物。作为真核生物, 家蚕生物反应器有着原核生物不可比拟的优点, 利用家蚕生产具特异性或经济价值高的蛋白质, 已成为研究的一个热点(杨瑞丽等, 2001; 胡敏等, 2001)。1989 年我国成功地建

立了家蚕 BmNPV-BmN 细胞表达载体系统, 与细菌、酵母及哺乳动物表达系统相比, 具有表达量较高、表达产物的翻译后加工性能及生物活性较强等特点(周亚竞等, 2000)。用家蚕宿主系统表达人类胶原蛋白也是家蚕生物反应器技术研究的一项重要进展

基金项目: 国家自然科学基金项目(39870410)

作者简介: 王云, 男, 1977 年 7 月生, 硕士研究生, 主要从事动物分子遗传学研究, E-mail: yunwang2001@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: zhenghongzuo@hotmail.com

收稿日期 Received: 2005-04-28; 接受日期 Accepted: 2005-08-15

(Tomita *et al.*, 2003)

已有的研究表明家蚕核型多角体病毒(BmNPV)早期即刻蛋白基因启动子(IE)、家蚕丝心蛋白重链基因启动子(Fib)在家蚕幼虫内可调控外源基因的表达(华刚等, 1994; 陈秀等, 1999)。肌动蛋白和微管蛋白是家蚕细胞的基本结构单位, 属于较高丰度的表达蛋白, 因而启动它们表达的细胞质肌动蛋白4基因启动子(A4)、 α 微管蛋白基因启动子(α -tub)也是较理想的启动子。转染果蝇和家蚕细胞的实验表明, IE和Fib两种启动子可以启动外源基因的表达(Angelichio *et al.*, 1991; Lu *et al.*, 1996)。

我们曾构建了含家蚕核型多角体病毒早期即刻蛋白基因启动子(BmNPV-IE), 以增强型绿色荧光蛋白EGFP基因为报告基因, 并插入了丝心蛋白重链基因部分序列的同源重组质粒(桂慕燕等, 2002), 通过精子介导法将该重组质粒转入家蚕幼虫和成虫, 初步探讨了IE启动元件在转基因家蚕中增强报告基因和外源基因表达活性的可行性(另文发表)。在此基础上, 本研究以红色荧光蛋白RFP基因作为报告基因, 分别构建含BmNPV-IE、Fib、A4和 α -tub启动子的重组表达质粒, 并将构建好的质粒分别转染家蚕胚胎细胞, 通过荧光显微镜观察红色荧光蛋白的瞬时表达活性, 分析上述各启动子在家蚕细胞内增强报告基因表达活性的情况, 筛选能启动外源基因在家蚕细胞中高效表达的启动子, 为建立转基因家蚕的技术平台提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒 pDsRed2-1 购自 Clontech 公司, pa-tubpiggyBac 由新西兰 Massey University 的 M. J. Scott 惠赠, pSLfa1180fa 及 pG350 由本实验室保存, 家蚕细胞株 Bm-e-HNU5 由华中师范大学姚汉超研究员惠赠。*EcoR* I、*EcoR* V、*Hind* III、*Bgl* II、*Not* I、*Bam* H I、T4 DNA 连接酶、牛小肠碱性磷酸酶(CIAP)、Taq 酶等购自宝生物工程(大连)有限公司。RNA 酶、溶菌酶、蛋白酶 K 购自上海 Sangon 公司; Grace 培养基、胎牛血清为 Gibco 公司产品; 小量柱式胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程公司; 脂质体 ESCORT 为 Sigma 公司产品。引物均由上海 Sangon 公司合成, 其中扩增 Fib 启动子的引物为: 5'-GGAGATCTGCAGTTGTCGTGCTAA-3'(*Bgl* II)和 5'-TTGGATCCTGAGAGTTGGAACCGAAC-3'(*Bam* H I);

扩增 A4 启动子的引物为: 5'-GCCGAGATCTACATCTTACTAATTTTCG-3'(*Bgl* II)和 5'-TAGGATCCTCAC TTCGTGGAATGTTG-3'(*Bam* H I); 扩增 IE 启动子的引物为: 5'-TTCGGAT CCGATTTGCAGTTCGGGA-3'(*Bam* H I)和 5'-GCCAAGCTTAGTCGTTTGTTGTTCA-3'(*Hind* III)。

1.2 方法

1.2.1 家蚕丝腺 DNA 的提取: 解剖 5 龄家蚕幼虫, 挑取后部丝腺, 液氮研磨后加入消化液, 加蛋白酶 K 至终浓度为 0.2 mg/mL, 56℃ 消化过夜, 加入 RNase 至终浓度为 0.4 mg/mL, 37℃ 6 h, 用等体积苯酚/苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)、氯仿:异戊醇(24:1)各抽提 1 次。在最后一次抽提的水相中加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc(pH 5.6), 混匀后加入 2 倍体积的无水乙醇沉淀 DNA, 用 70% 乙醇漂洗, 室温干燥后加入适量 TE 溶解, -20℃ 冷冻保存。

1.2.2 PCR 扩增: 反应体系(25 μ L): 10 \times buffer 2.5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 2.0 μ L, dNTPs 2.0 μ L, Taq 酶 1 U, 25 μ mol/L 上、下游引物各 0.5 μ L, 20 ng/ μ L 模板 DNA 2.5 μ L, 加 ddH₂O 至 25 μ L。反应程序: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 40 s, 55℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 共 30 个循环, 72℃ 延伸 7 min, 4℃ 保存。

1.2.3 质粒构建: 将质粒 pa-tubpiggyBac 及 pSLfa1180fa 用 *Not* I + *EcoR* V 双酶切, 分别回收小片段和大片段, 回收产物连接得到中间质粒 pSL- α -tub。接着用 *Hind* III + *Bam* H I 对 pSL- α -tub 和 pDsRed2-1 进行双酶切, 分别回收小片段及大片段, 将大小片段连接得到目的质粒 pDsRed- α -tub。PCR 扩增 A4 启动子, 将回收的扩增产物作 *Bgl* II + *Bam* H I 双酶切, 同时对载体 pDsRed2-1 进行 *Bgl* II 单酶切, 回收线性质粒并去磷酸化后连接酶切产物, 得到重组质粒 pDsRed-A4。PCR 扩增 IE 启动子, 将回收的扩增产物及载体 pDsRed2-1 分别作 *Bgl* II + *Hind* III 双酶切, 酶切产物连接、转化, 获得重组质粒 pDsRed-IE。重组质粒 pDsRed-Fib 的构建参照 pDsRed-A4。

1.2.4 细胞株 Bm-e-HNU5 培养: 细胞用 Grace 完全培养液(Grace 培养基 + 20% 胎牛血清 + 青霉素 100 U/mL + 链霉素 100 U/mL, pH 6.3)于 28℃ 密闭培养, 待细胞密布于培养液中时(3~4 天)传代。

1.2.5 脂质体转染家蚕细胞: 将 5 μ L 脂质体同 1.5 μ g 质粒混合, 补加无血清培养液至 80 μ L, 室温孵育 15 min。同时将培养板内的细胞吸入无菌的 1.5 mL 离心管中, 280 \times g 离心 12 min, 弃上清液。脂质体/

质粒混合物中加入 520 μ L Grace 完全培养液,混匀后将此转染体系加到去上清液的细胞沉淀中,轻轻吹打混匀细胞,28℃ 孵育 10 ~ 11 h。280 \times g 离心 15 min,弃上清液,加入 0.6 mL 新鲜的 Grace 完全培养液,将经转染处理的细胞轻轻吹打均匀后,转移到培养板中,28℃ 培养。

1.2.6 转染细胞荧光显微镜观察:以绿色光作为激发光源,荧光显微镜下每隔 24 h 观察 *RFP* 报告基因在转染家蚕细胞内的瞬时表达情况,用共聚焦显微镜扫描并拍照。

2 结果与分析

2.1 质粒构建

根据 NCBI 检索到的 A4、IE 和 Fib 启动子序列,分别设计引物并进行 PCR 扩增,结果表明设计的引物可以分别扩增出 3 种启动子序列(图 1),扩增片段的大小与预期一致。其中扩增 BmNPV-IE 启动子的模板为质粒 pG350,扩增 A4 和 Fib 启动子的模板为家蚕丝腺 DNA。

重组表达质粒 pDsRed- α -tub 酶切鉴定,重组表达质粒 pDsRed-A4、pDsRed-IE 和 pDsRed-Fib 分别经 PCR 和酶切鉴定(图 2),结果表明上述含不同启动子的重组质粒均已构建成功。

2.2 重组质粒的表达

共聚焦显微镜观察的结果表明,4 种启动子均能启动 *RFP* 报告基因在家蚕细胞内的瞬时表达,但相对于其他 3 种启动子,A4 启动子启动报告基因瞬

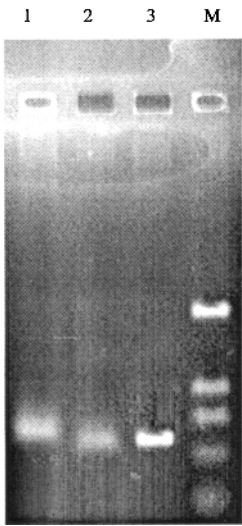


图 1 PCR 扩增不同启动子的电泳图谱

Fig. 1 Electrophoresis analysis of PCR result of different promoter

1: IE 启动子 IE promoter; 2: Fib 启动子 Fib promoter; 3: A4 启动子 A4 promoter; M: 标准分子量 DNA marker DL2000.

时表达的效率较低,4 种启动子启动 *RFP* 报告基因的效率依次为 $A4 < \alpha$ -tub $<$ IE $<$ Fib(图 3)。它们的最高表达率分别为 5%、18%、67% 和 98%。空白对照组、原始质粒 pDsRed2-1 对照组均未观察到红色荧光蛋白的瞬时表达活性。

4 种重组表达质粒转染家蚕细胞后,24 h 内未见表达,转染 48 h 后可以观察到红色荧光蛋白的表达,72 ~ 96 h 到达峰值,约 10 天开始消退,15 天后在 568 nm 处已基本上观察不到红色荧光蛋白的表达,暗示瞬时表达的红色荧光蛋白可能已经被降解。另

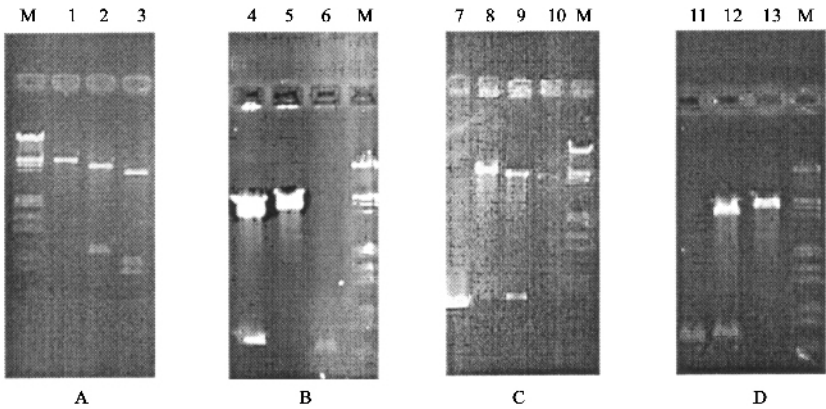


图 2 重组质粒的酶切或 PCR 鉴定图谱

Fig. 2 Electrophoresis analysis of recombinant plasmid by restriction enzyme digestion or PCR

A: pDsRed- α -tub; B: pDsRed-A4; C: pDsRed-IE; D: pDsRed-Fib.
M: λ DNA/*Eco*R I + *Hind* III; 1: *Hind* III; 2: *Hind* III + *Bam*H I; 3: *Not* I + *Eco*R V; 4: *Bgl* II + *Bam*H I; 5: *Bam*H I; 6: PCR 扩增 A4 (PCR product of A4); 7: PCR 扩增 IE (PCR product of IE); 8: *Hind* III; 9: *Bgl* II + *Hind* III; 10: 质粒 pDsRed2-1 的 *Hind* III 酶切 (pDsRed2-1 digested with *Hind* III); 11: PCR 扩增 Fib (PCR product of Fib); 12: *Bgl* II + *Bam*H I; 13: *Bam*H I.

外, Sacchetti 等(2002)曾报道, 表达后的红色荧光蛋白有一个成熟过程, 即寡聚化的过程, 用 568 nm 波长激发而发红色荧光的细胞改用 488 nm 激发, 则可

以看到绿色荧光, 并且发光部位与红色荧光发光部位基本重合, 我们的结果与 Sacchetti 等(2002)的结果一致。

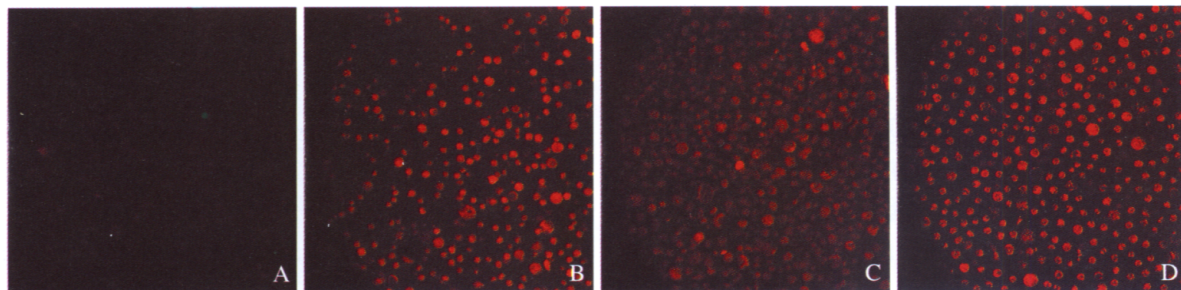


图3 重组质粒转染家蚕 Bm-e-HNU5 细胞 96 h 后共聚焦显微镜检测结果 (10 × 20)

Fig. 3 Results of transfecting recombinant plasmid into Bm-e-HNU5 cells

scanned by laser scanning confocal microscopy at 96 h (10 × 20)

A: pDsRed-A4; B: pDsRed- α -tub; C: pDsRed-IE; D: pDsRed-Fib.

3 讨论

目前关于悬浮细胞转染方法的报道还不多, Elnitski 和 Hardison(1999)认为阳离子脂质体介导法是瞬时转染小鼠红白血病(mouse erythroleukemia)细胞的有效且可靠的方法, 同时指出细胞株的不同会在很大程度上影响转染效率。我们经过 10 次左右的重复试验, 得到了 2 次比较理想的转染效果, 说明运用阳离子脂质体介导法能将外源质粒导入悬浮培养的家蚕细胞, 但实验的重复性还不高, 这可能与本实验用的家蚕细胞株 Bm-e-HNU5 来源于胚胎细胞系有关。

我们在以前的实验中发现, 家蚕在幼虫阶段体表面有较强的自发绿色荧光, 而无明显的自发红色荧光, 因此, 如果以红色荧光蛋白作为报告基因, 可以很容易地检测转基因家蚕中外源基因是否表达。另外, 红色荧光蛋白有着其他报告基因所不具备的优点, 如信噪比高, 细胞内的荧光转换率高, 灵敏度高, 较绿色、蓝色和黄色荧光信号清晰, 观察方便, 对极端 pH 值和光漂白抗性强等(Baird *et al.*, 2000)。本研究结果表明在家蚕细胞株 Bm-e-HNU5 中, 利用红色荧光蛋白作为报告基因来筛选不同启动子是可行的。

从本实验结果来看, IE 启动子可以启动 *RFP* 基因在家蚕细胞中的表达, 而且传到第 3 代后红色荧光才渐渐消失。Fib 和 α -tub 两种启动子启动 *RFP* 基因各有两次高表达, 但是不如 IE 稳定, 值得深入研究。另外, 从我们的研究结果看, 在家蚕细胞的体

外实验中, A4 启动子不适合作为启动外源基因表达的启动子。

参考文献 (References)

- Angelichio ML, Beck JA, Johansen H, Ivey-Hoyle M, 1991. Comparison of several promoters and polyadenylation signals for use in heterologous gene expression in cultured *Drosophila* cells. *Nucleic Acids Research*, 19(18): 5 037 – 5 043.
- Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY, 2000. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 11 984 – 11 989.
- Chen X, Zhao Y, Zhang F, Peng WP, Feng XL, Huang JT, Lu CD, 1999. Transformation of neomycin resistance gene (*neo^R*) into silkworm (*Bombyx mori* L.). *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 31(1): 90 – 92. [陈秀, 赵昀, 张峰, 彭卫平, 冯晓黎, 黄君霆, 陆长德, 1999. 新霉素抗性基因在家蚕中的插入和表达. 生物化学与生物物理学报, 31(1): 90 – 92]
- Gui MY, Ye XQ, Wu CX, Xiong XF, 2002. Construction of a homologous recombinant plasmid vector pMD-Fib-IE-EGFP carrying EGFP as reporter gene. *Journal of Xiamen University (Natural Science Edition)*, 41(5): 628 – 633. [桂燕燕, 叶向群, 吴春旭, 熊秀芳, 2002. 含增强型绿色荧光蛋白(EGFP)基因的家蚕同源重组质粒载体的构建. 厦门大学学报(自然科学版), 41(5): 628 – 633]
- Hu M, Liu YL, Qi YP, Zhu Y, 2001. Expression of tumor necrosis factor in *Bombyx mori* by host range expanded recombinant AcNPV. *Journal of Wuhan University (Nat. Sci. Ed.)*, 47(6): 732 – 736. [胡敏, 刘映乐, 齐义鹏, 朱应, 2001. 用宿主范围扩大的重组 AcNPV 在家蚕中表达 TNF. 武汉大学学报(理学版), 47(6): 732 – 736]
- Hua G, Qian B, Wu XF, 1994. Transient expression of β -galactosidase in *Bombyx mori* cell (Bm-N) under the regulation of fibroin gene promoter. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 26(5): 549 – 553. [华刚, 钱斌, 吴祥甫, 1994. 家蚕丝蛋白基因启动子调控 β -半乳糖苷酶在家蚕细胞系中的瞬时表达. 生物化学与生物物理学报, 26(5): 549 – 553]

Elnitski L , Hardison R , 1999. Efficient and reliable transfection of mouse erythroleukemia cells using cationic lipids. *Blood Cells , Molecules , and Diseases* , 25(19): 299 – 304.

Lu ML , Johnson RR , Iatrou K , 1996. Trans-activation of a cell housekeeping gene promoter by the IE1 gene product of baculoviruses. *Virology* , 218(1): 103 – 113.

Sacchetti A , Subramaniam V , Jovin TM , Alberti S , 2002. Oligomerization of DsRed is required for the generation of a functional red fluorescent chromophore. *FEBS Letters* , 525 : 13 – 19.

Tomita M , Munetsuna H , Sato T , Adachi T , Hino R , Hayashi M , Shimizu K , Nakamura N , Tamura T , Yoshizato K , 2003. Transgenic silkworms produce recombinant human type III procollagen in cocoons. *Nature Biotechnology* , 21 : 52 – 56.

Yang RL , Jin YF , Wu YC , Zhang YZ , Wu XF , 2001. Research on the production of useful protein using silkworm *Bombyx mori* as a bioreactor. *Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci.)* , 27 (2): 173 – 178. [杨瑞丽 , 金勇丰 , 吴玉澄 , 张耀洲 , 吴祥甫 , 2001. 利用家蚕生物反应器生产有用蛋白的研究. 浙江大学学报(农业与生命科学版) , 27(2): 173 – 178]

Zhou YJ , Zhang ZF , He JL , 2000. Establishment and suspension cultivation of silkworm *Bombyx mori* cell line BmN-ZJ-S. *Sericulture Science* , 26 (1): 34 – 37. [周亚竞 , 张志芳 , 何家禄 , 2000. 家蚕悬浮培养细胞系的建立及悬浮培养. 蚕业科学 , 26(1): 34 – 37]

(责任编辑 : 黄玲巧)